

AD-A036 703

NAVAL BLOOD RESEARCH LAB BOSTON MASS

F/G 6/5

A SIMPLE METHOD TO WASH FREEZE-PRESERVED RED CELLS CONTAINING 4--ETC(U)
NOV 73 C R VALERI

UNCLASSIFIED

| OF |

AD
A036 703

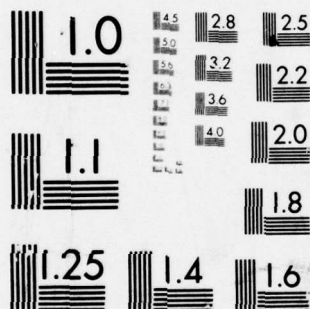


NL



END

DATE
FILMED
4-77



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS-1963-A

ADA 036703

12

A Simple Method to Wash Freeze-Preserved Red Cells Containing 40% or 20% W/V Glycerol Using Sodium Chloride Solutions

CDR C. R. Valeri, MC, USNR

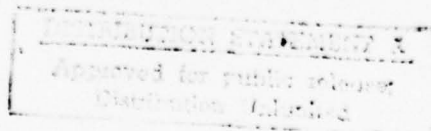
Seit über 20 Jahren werden im Naval Blood Research Laboratory, Chelsea, Massachusetts, wissenschaftliche Untersuchungen zur Tiefkühlkonservierung von Blut durchgeführt. Als Schutzsubstanz wird Glycerin in 20%iger bzw. 40%iger Konzentration verwendet. In ACD-Stabilisator entnommene Erythrozyten sollen nicht länger als 24 Stunden vor dem Einfrierprozess gelagert werden, weil sonst die Sauerstofftransportfunktion ungünstig beeinflusst wird. Im CPD-Stabilisator können die Erythrozyten dagegen 3 bis 5 Tage vor dem Einfrieren gelagert werden. Durch den Einfrier- und Auftauvorgang selbst wird die Sauerstofftransportfunktion der Erythrozyten nicht wesentlich beeinträchtigt. Solche Blutkörperchen werden als "non-rejuvenated" (nicht-verjüngt) angesehen, während Blutkörperchen, die nach einer 3 bis 5 täglichen Lagerung in CPD und anschließender Hinzufügung von Pyruvat, Inosin, Glukose, Phosphat und Adenin (PIGPA) als "indated-rejuvenated" (während der zulässigen Lagerungszeit verjüngt) betrachtet werden. Wurden Blutkörperchen in ACD oder CPD maximal 28 Tage gelagert, danach mit dieser PIGPA-Lösung versetzt, so werden sie als "outdated-rejuvenated" (nach Ablauf der Lagerungszeit verjüngt) angesehen.

Der nach dem Auftauen notwendige Waschvorgang entfernt nicht nur das Glycerin, sondern auch die mit der "rejuvenation"-Lösung (PIGPA) hinzugefügten Substanzen. Das Auswaschen des Glycerins erfolgt durch NaCl-Lösung in einem der drei erhältlichen Waschsysteeme (s. u.).



(See form 1473)

Naval Blood Research Laboratory, Chelsea, Massachusetts 02150 USA



Material und Methoden

Die Entnahme des Blutes und Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ vor dem Hinzufügen von Glycerin: Blut wird in CPD-Stabilisator in einem Dreifach-Blutbeutel entnommen und anschließend 3 Minuten bei $4500 \times g$ in einer Sorvall RC 3 Zentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma wird in den Transferbeutel übergepreßt und daraus das Thrombozyten-Konzentrat hergestellt, während aus dem plättchenarmen Plasma das Kryopräzipitat genommen wird. Die roten Blutkörperchen werden bis zu 5 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert. Darauf geachtet wird, daß der Hämatokrit des Erythrozyten-Konzentrats bei etwa 70 V % liegt. Sofern die Erythrozyten während dieser Zeit nicht transfundiert worden sind, werden sie eingefroren. Vor der Glycerinzugabe wird zunächst durch erneute Zentrifugation (7 Minuten bei $3000 \times g$) alles Plasma entfernt (Hämatokrit 90 V %).

Blut, das entweder 3 bis 5 Tage oder bis zu 34 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert worden ist, wird vor dem Einfrieren mit 50 ml folgender Lösung versetzt ("rejuvenated"), die in 1 Liter enthalten:

	9 g	NaCl
	50 mmol	Pyruvat
	50 mmol	Inosin
	100 mmol	Glukose
	50 mmol	Phosphat
	5 mmol	Adenin
	pH-Wert	7,2

Diese PIGPA-Lösung wird durch eine Y-Verbindung aseptisch dem Erythrozyten-Konzentrat (Hämatokrit 70 V %) hinzugefügt, anschließend werden die Erythrozyten für 1 Stunde bei $+37^{\circ}\text{C}$ in ein Wasserbad gebracht. Danach zentrifugiert, der Überstand entfernt (der Hämatokrit beträgt nunmehr 90 V %) und das Glycerin hinzugefügt.

Blutkörperchen mit 40 % W/V Glycerinzusatz

Verwendet wird eine 6,2 M Glycerin-Lösung folgender Zusammensetzung:

100 ml enthalten	57,1 g	Glycerin
	0,03 g	Kaliumchlorid
	0,04 g	Magnesiumchlorid
	1,60 g	Natriumlactat
	0,08 g	Di-natriumphosphat
	pH-Wert	6,8

Die Zugabe der Glycerin-Lösung erfolgt entsprechend den in der Tab. 1 angegebenen Volumina. Sowohl die Zellen als auch die Glycerin-Lösung wurden vorher 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Zunächst wird nur eine kleine Menge Glycerin unter leichtem Schütteln hinzugefügt (s. Tab. 1). Danach wird für 15 bis 20 Sekunden mit höherer Geschwindig-

ACCESSION for	
WHS	White Section <input checked="" type="checkbox"/>
DDG	Bull. Section <input type="checkbox"/>
UNANNOUNCED	
JUSTIFICATION	
BY	
DISTRIBUTION/AVAILABILITY CODES	
DIS.	AVAIL. and/or SPECIAL
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

keit geschüttelt (250 bis 300 Rotationen in der Minute) und nach etwa 10 Minuten der Rest der erforderlichen Glycerinmenge zugegeben. Der Plastikbeutel wird in einen speziellen Metallrahmen gebracht und bei -80°C eingefroren.

Table 1
Nomogram for Matching the Weight of Concentrated Red Cells and the Volume of the 6,2 M Glycerol Solution

Weight of Concentrated Red Cells (gm)	Initial Volume of Glycerol Solution Added (ml)	Total Volume of Glycerol Solution Added (ml)
75 - 125	15	200
126 - 175	25	250
176 - 225	50	300
226 - 275	75	350
276 - 325	100	400

Blutkörperchen mit 20 % W/V Glycerinzusatz

Verwendet wird folgende Glycerin-Lösung:

100 ml enthalten 35,0 g Glycerin
 2,88 g Mannit
 0,65 g NaCl

Entsprechend dem Gewicht des Erythrozyten-Konzentrates (Hämatokrit 90 V %) wird die gleiche Menge Glycerin-Lösung (in ml) hinzugefügt, wobei ebenfalls wieder eine Schüttelapparatur verwendet wird (150 bis 200 Rotationen/min). Erythrozyten und Glycerin-Lösung werden vor dem Einfrieren 2 Stunden bei Raumtemperatur gelassen. Sofern vor dem Einfrieren eine "rejuvenation" vorgenommen worden ist, werden sie noch zusätzlich 1 Stunde bei $+37^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die mit Glycerin versetzten Erythrozyten werden durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren (-196°C), die Lagerung erfolgte in der Gasphase (-150°C).

Auftauen, Waschen und Lagerung in der Auftauperiode

Blutkörperchen mit 40 % W/V Glycerinzusatz

Durch leichte Bewegungen werden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei $+37^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 10 Minuten aufgetaut. Das Auswaschen des Glycerins erfolgte mit einer der folgenden automatischen Waschsyste:

1. Haemonetics Modell 15 Blood Processor
2. FENWAL ELUTRAMATIC System
3. IBM Blood Cell Processor

Verwendet werden dazu folgende Kochsalz-Konzentrationen:

150 ml 12 % NaCl-Lösung pH 7,2
 (gepuffert mit 0,15 % Di-Natrium-Phosphat)

1 oder 2 Liter 1,6 % NaCl-Lösung pH 7,2
(gepuffert mit 0,03 % Di-Natrium-Phosphat)
1 Liter 0,8 % NaCl-Lösung,
die 0,2 % Glucose enthält und mit
0,065 % Di-Natrium-Phosphat auf einen pH-Wert von 6,8
eingestellt ist.

Blutkörperchen mit 20 % W/V Glycerinzusatz

Die eingefrorenen Zellen werden im Wasserbad bei +42°C
innerhalb 6 Minuten unter leichtem Hin- und Herbewegen
aufgetaut. In einem der oben beschriebenen Waschsyste-
me wird dann das Glycerin entfernt.

Folgende Lösungen werden verwendet:

500 ml 3,2 % NaCl-Lösung pH 7,2
(gepuffert mit 0,065 % Di-Natrium-Phosphat)
1 oder 2 Liter 0,8 % NaCl-Lösung,
die 0,2 % Glucose enthält und mit
0,065 % Di-Natrium-Phosphat auf einen
pH-Wert von 6,8 eingestellt ist.

Auswaschen des Glycerins

1. Haemonetics Modell 15, Blood Processor

Prinzip: Kontinuierliches Waschen in einem speziellen
Zentrifugenkopf, wobei die Waschlösungen nach dem Schwer-
kraftprinzip hinzugefügt werden.

a) Erythrozyten mit 40 % W/V Glycerinzusatz

Zunächst werden die aufgetauten Erythrozyten mit 150 ml
der 12 %igen Kochsalzlösung verdünnt und mindestens
2 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach
zusammen mit der 1,6 %igen Kochsalzlösung in den
Zentrifugenkopf eingebracht (4800 U/min) und gewaschen.
Daran schließt sich das Waschen mit der 0,9 % NaCl-
Glucose-Phosphat-Lösung an.
Bei einer Durchflußrate von etwa 200 ml/min dauert das
Waschen etwa 15 bis 20 Minuten. Die Resuspension der
gewaschenen Zellen erfolgt in dem Rest der 0,9 % NaCl-
Glucose-Phosphat-Lösung bei einem Hämatokrit von 40 V %.
Das Blut wird vor der Transfusion bis zu 24 Stunden bei
+4°C gelagert.

b) Erythrozyten mit 20 % W/V Glycerinzusatz

Die aufgetauten Erythrozyten werden mit 500 ml der
3,2 %igen Kochsalzlösung verdünnt, nach dem Schwer-
kraftprinzip in den Zentrifugenkopf eingebracht, bis dieser
gefüllt ist und gewaschen. Der Rest wird mit der 0,9 %igen
Kochsalzlösung (die 200 mg Glucose und 0,065 % Di-
Natrium-Phosphat enthält, pH 6,8) gewaschen.
Bei einer Durchflußrate von etwa 200 ml/min beträgt die

Waschzeit etwa 15 bis 20 Minuten. Die Zellen werden bis zu 24 Stunden bei +4°C gelagert (Hämatokrit 40 V %). Vor der Transfusion erfolgt im allgemeinen noch eine Konzentration (Hämatokrit 70 V %).

In dem gleichen Zentrifugenkopf können bis zu 2 Einheiten Blut der gleichen ABO- und Rh-Gruppe für einen Patienten gewaschen werden.

2. FENWAL ELUTRAMATIC System

Prinzip: Es werden immer zwei Einheiten zu gleicher Zeit kontinuierlich in einem speziellen Beutelsystem (ELUTRA-PACK) nach dem Gegenstromprinzip gewaschen.

a) Erythrozyten mit 40 % W/V Glycerinzusatz

Zunächst werden die aufgetauten Blutkörperchen mit 150 ml der 12%igen NaCl-Lösung verdünnt und für mindestens 2 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

Anschließend Zugabe von 500 ml der 1,6%igen Kochsalzlösung, danach Hinzufügen von 2 Litern der 1,6%igen Kochsalzlösung. Insgesamt wird mit 2,7 Litern Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Waschen werden die Zellen entweder konzentriert (Entfernung des Überstandes durch Zentrifugation bei 3100 U/min für 2 Minuten) oder mit einem Hämatokrit von 40 V % für maximal 24 Stunden bei +4°C gelagert. Im letzteren Fall kann vor der Transfusion noch eine Konzentration auf einen Hämatokrit von 70 V % erfolgen.

b) Erythrozyten mit 20 % W/V Glycerinzusatz

Die aufgetauten Erythrozyten werden zunächst mit 250 ml einer 3,2%igen Kochsalzlösung verdünnt und dann zusammen mit 500 ml der 3,2%igen Kochsalzlösung in das ELUTRA-PACK-System eingefüllt. Daran schließt sich ein Waschvorgang mit 1 Liter 0,9%iger Kochsalzlösung an, die 200 mg % Glucose enthält und mit 65 mg % Di-Natrium-Phosphat auf einen pH von 6,8 eingestellt worden ist. Nach dem Waschen werden die Zellen entweder konzentriert oder mit einem Hämatokrit von 40 V % bei +4°C für maximal 24 Stunden gelagert.

Die Tab. 2 u. 3 zeigen verschiedene Waschprozeduren für die Entfernung von Glycerin.

Table 2
Comparison of methods for whashing 40% W/V glycerolized
red cell frozen within 3 to 5 days of collection in CPD and
stored at -80°C

	IBM Blood Processor (2,2 liters)	FENWAL ELUTRAMATIC (2,7 liters)
Freeze-Thaw Recovery (%)	98 %	98 %
Freeze-Thaw Wash Recovery (%)	90 %	90 %
Sub Hb (mg %)	100 mg %	100 mg %
Red Cell K ⁺	10 %	10 %
Residual ¹²⁵ I Albumin	<0,2 %	<0,2 %
CEP Negative- RIA Positive Units After 100X Concentration	Neg.	Neg.
Residual Glycerol (%)	<0,3 %	<0,3 %
	Haemonetics Model 15 (3,2 liters)	Huggins Cytoglomerator (4,7 liters)
Freeze-Thaw Recovery (%)	98 %	98 %
Freeze-Thaw- Wash Recovery (%)	90 %	80 %
Sub Hb (mg %)	100 mg %	200 mg %
Red Cell K ⁺	10 %	25 %
Residual ¹²⁵ I Albumin	<0,2 %	3,5 %
CEP Negative- RIA Positive Units After 100X Concentration	Neg.	Pos.
Residual Glycerol (%)	<0,4 %	1,5 %

Table 3
Comparison of methods for washing 20 % W/V glycerolized red cells frozen within 3 to 5 days of collection in CPD and stored at -150°C

	IBM Blood Processor (1,5 liters)	FENWAL ELUTRAMATIC (1,7 liters)	Haemonetics Model 15 (2,5 liters)
Freeze-Thaw Recovery (%)	97 %	97 %	97 %
Freeze-Thaw-Wash Recovery(%)	90 %	90 %	90 %
Sup Hb (mg %)	150 mg %	150 mg %	150 mg %
Red Cell K ⁺	10 %	10 %	10 %
Residual ¹²⁵ I Albumin	<0,3 %	<0,2 %	<0,4 %
CEP Negative-RIA Positive Units After 100X Concentration	Neg.	Neg.	Neg.
Residual Glycerol (%)	<0,3 %	<0,4 %	<0,5 %

3. IBM Blood Processor

Prinzip: Automatischer diskontinuierlicher Waschvorgang (unterbrochen durch Zentrifugationen)

a) Erythrozyten mit 40 % W/V Glycerinzusatz

Die aufgetauten Blutkörperchen werden zunächst mit 150 ml 12 %iger Kochsalzlösung verdünnt, bei Raumtemperatur für 2 Minuten stehengelassen und danach 500 ml einer 1,6 %igen Kochsalzlösung hinzugefügt. Etwa die Hälfte dieses Volumens der auf diese Weise verdünnten Erythrozyten werden in einen Spezialbeutel gebracht, zentrifugiert und der Überstand verworfen, danach die andere Hälfte in der gleichen Weise gewaschen. Das weitere Waschen erfolgte anschließend mit 1,6 %iger Kochsalzlösung, wobei die Entfernung des Überstandes und die Zufuhr der Waschflüssigkeit auf etwa 350 ml/min eingestellt wird.

b) Erythrozyten mit 20 % W/V Glycerinzusatz

Das Auswaschen des Glycerins erfolgt mit dem gleichen Programm. Zunächst werden 500 ml einer 3,2 %igen Kochsalzlösung hinzugefügt, danach mit 0,9 g %iger Kochsalz-Glucose-Phosphat-Lösung gewaschen. Die Waschzeit beträgt etwa 16 Minuten.

Ergebnisse

Die Abb. 1 und 2 zeigen schematisch das Prinzip, nach dem Blutkörperchen mit 20% W/V bzw. 40% W/V Glycerinzusatz ausgewaschen werden. In den Abb. 3 und 4 werden verschiedene Parameter graphisch dargestellt, wenn Erythrozyten mit dem IBM Blood Processor ausgewaschen werden. Die Abb. 5 gibt die Werte wieder, wenn das Auswaschen mit dem ELUTRAMATIC Waschsystem erfolgt. Die besten Resultate werden erzielt, wenn das Auswaschen entsprechend dem Cycle 4 (s. Tab. 4) durchgeführt wurde. Der Hämatokrit der fertig gewaschenen Erythrozyten-Suspension beträgt 40 V %, die Waschzeit ca. 20 Minuten. Die Erythrozyten werden in der Auftauperiode für maximal 24 Stunden bei +4°C gelagert, wobei sie vor der Transfusion im allgemeinen wieder auf einen Hämatokrit von 70 V % eingestellt werden.

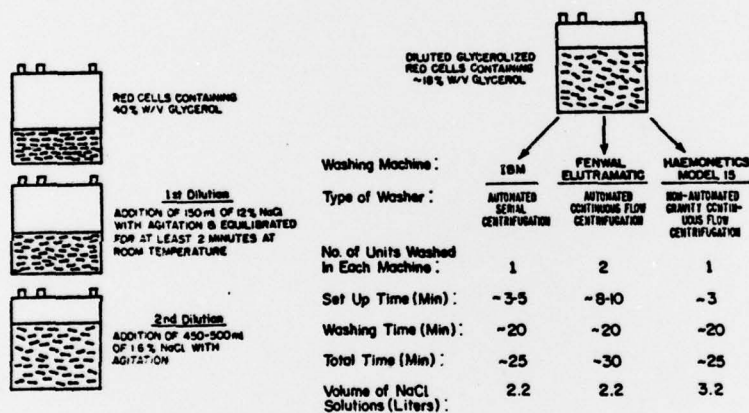


Abbildung 1

Dilution of 40% W/V glycerolized red cells first with 150 ml of 12% sodium chloride, and then with 450-500 ml of 1.6% sodium chloride solution, prior to recovery and washing with just sodium chloride solutions in one of the three systems.

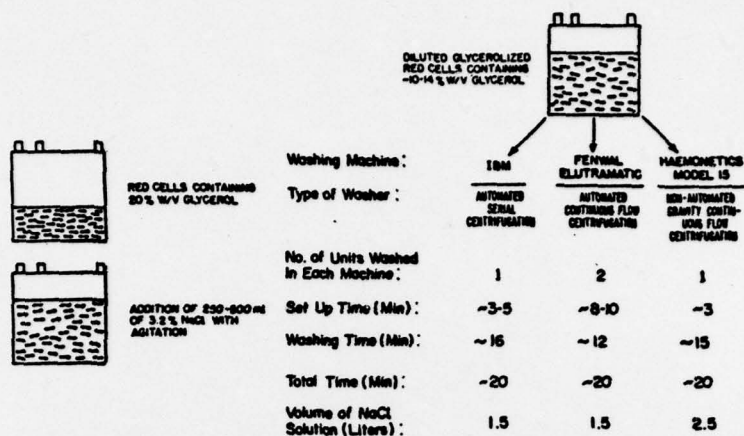


Abbildung 2

Dilution of 20% W/V glycerolized red cells with 250-500 ml of 3,2% sodium chloride solutions prior to recovery and washing with just sodium chloride solutions in one of the three systems.

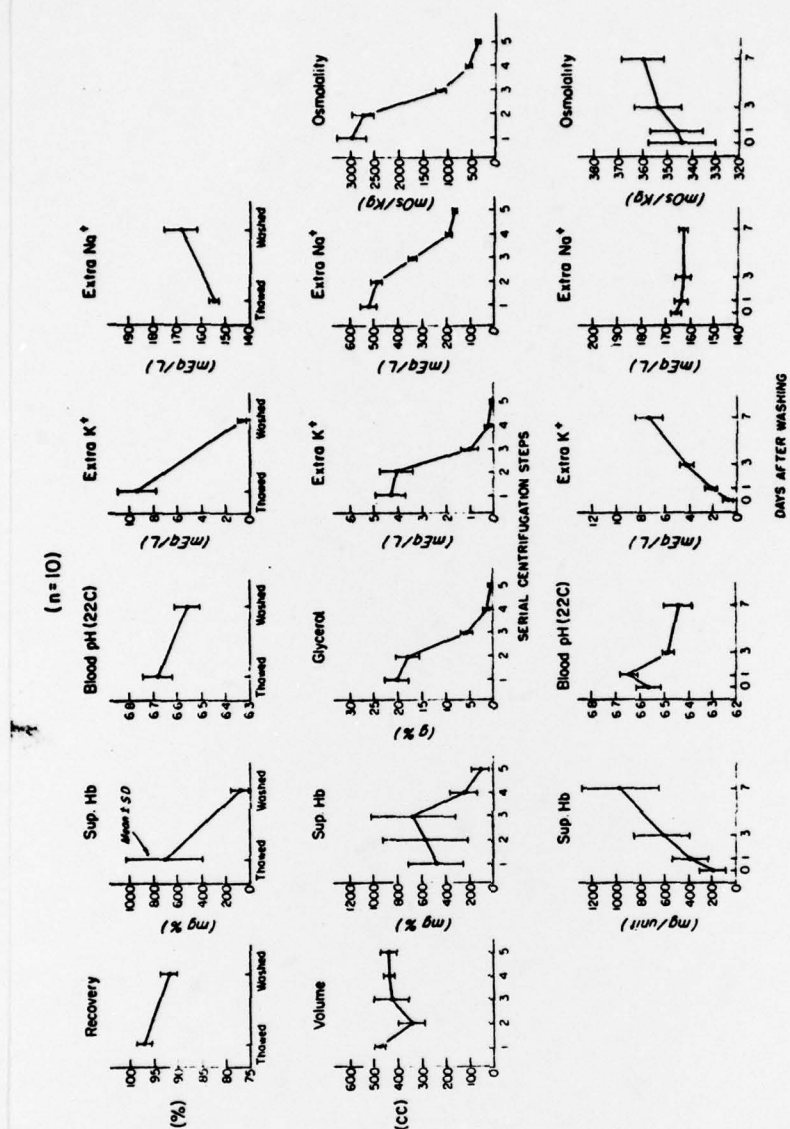


Abbildung 3

Effects of washing previously frozen red cells containing 20% W/V glycerol in the IBM Blood Processor. The thawed red cells were diluted with 500 ml of 3,2% sodium chloride solution and equilibrated at room temperature for at least 2 minutes. The diluted red cells were recovered in the IBM centrifuge bag and then washed twice more by dilution and centrifugation. The washed red cells were stored in a sodium chloride-glucose-phosphate solution at 4°C for 7 days.

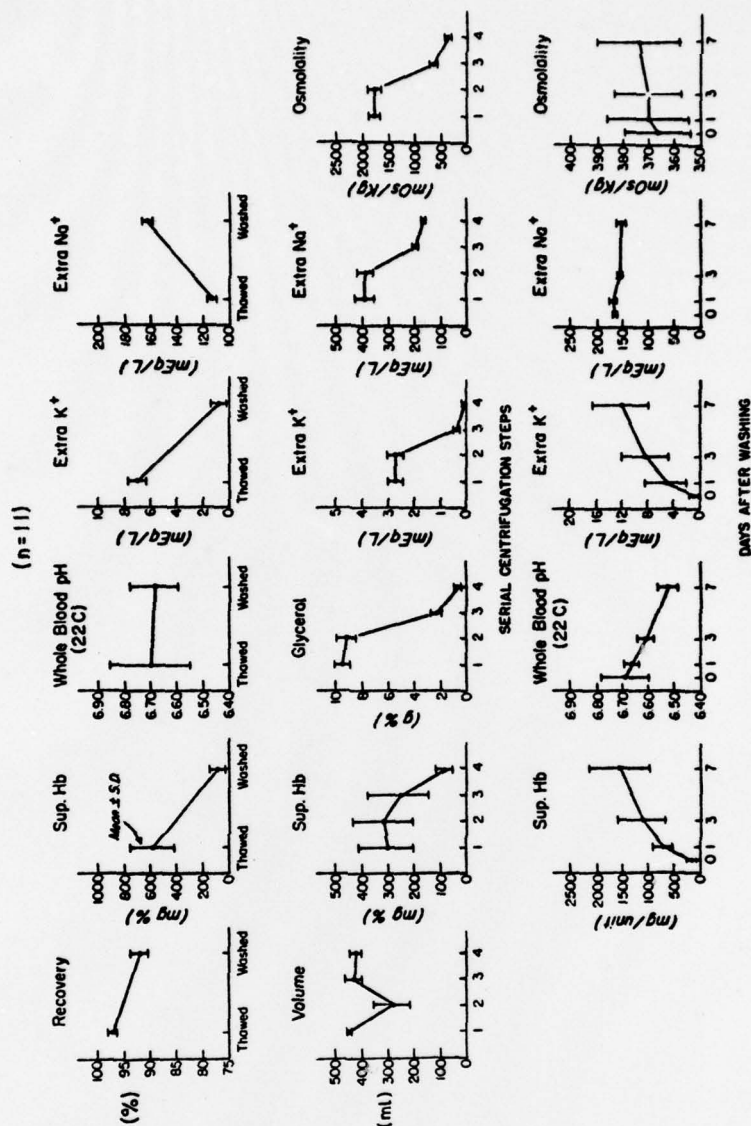


Abbildung 4

Effects of washing previously frozen red cells containing 40% W/V glycerol in the IBM Blood Processor. The thawed red cells were diluted with 150 ml of 12% sodium chloride solution, equilibrated at room temperature for at least 2 minutes and then diluted with 400-450 ml of 1.6% sodium chloride solution. The diluted red cells were then recovered in the IBM centrifuge bag and washed three more times by dilution and centrifugation. The washed red cells were stored in a sodium chloride-glucose-phosphate solution at 4°C for 7 days.

The 4 cycles employed in the FENWAL ELUTRAMATIC to wash previously frozen red cells containing 20 % W/V glycerol. Cycles 1 and 4 required the y-sets to simultaneously add the diluted blood and the 3,2 % sodium chloride solution. Y-sets were not needed with cycles 2 and 3 because the diluted blood was added first and then the sodium chloride solutions. Only cycle 4 was used during preparation of the red cells for clinical transfusion.

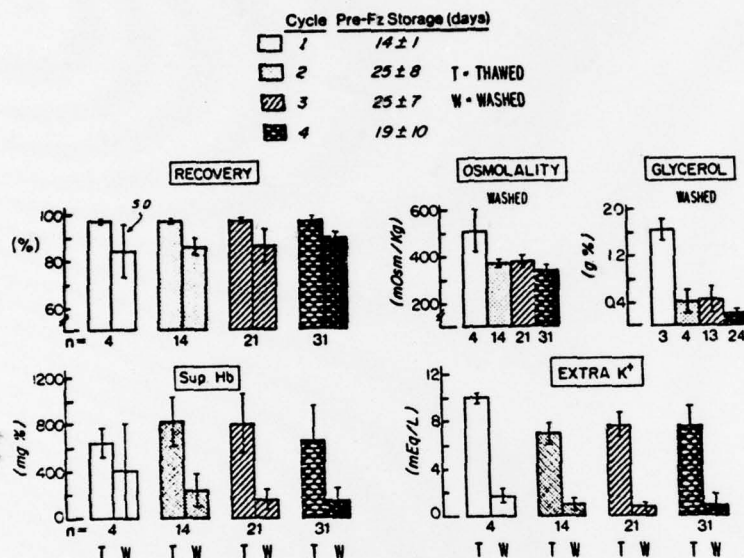


Abbildung 5

Effects of washing previously frozen red cells in the FENWAL ELUTRAMATIC using the 4 wash cycles shown in Figure 5. The red cells were stored in ACD at 4°C for up to 5 weeks, and incubated at 37°C for 1 hour with the PIGPA, Solution A, after which they were frozen with 20 % W/V glycerol and stored at -150°C from 7 to 93 days. The red cells were thawed at 42°C with agitation and were washed with 1,5 liters of sodium chloride solutions.

Table 4

Cycle 1	{	Thawed Blood + 500 ml of 3,2 % NaCl Diluted Blood + I.O.L of 0,9 % NaCl Together Diluted Blood Fill Bag
Cycle 2	{	Thawed Blood + 500 ml of 3,2 % NaCl Diluted Blood Fill Bag Diluted Blood Alone Followed by I.O.L of 0,9 % NaCl NaCl
Cycle 3	{	Thawed Blood + 500 ml of 3,2 % NaCl + 200 ml of 0,9 % NaCl Fill Bag Diluted Blood Alone Followed by I.O.L of 0,9 % NaCl NaCl
Cycle 4	{	Thawed Blood + 250 ml of 3,2 % NaCl Fill Bag Diluted Blood + 250 ml of 3,2 % NaCl Together Followed by I.O.L of 0,9 % NaCl

An den aufgetauten und gewaschenen Erythrozyten werden bakteriologische Kontrollen durchgeführt sowie u. a. folgende Parameter bestimmt: Recovery in vitro, Kalium- und Hb-Gehalt im Überstand, Kaliumgehalt der Erythrozyten, 2,3 Diphosphoglycerinsäure (DPG), ATP und Sauerstoff-Dissoziationskurve, Lactat, Harnsäure, Kreatinin, Inosin, Hypoxanthin und pH-Wert des Blutes.

Die Bestimmung der Erythrozyten-Überlebenszeit homolog transfundierter Blutkörperchen erfolgt sowohl mit der Chrom-Technik als auch mittels automatisierter Differentialagglutination.

Die therapeutische Effektivität wird berechnet aus der Multiplikation des in vitro Recovery-Prozentsatzes mit dem Prozentsatz der Überlebensrate nach 24 Stunden.

Die Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen: Blutkörperchen, die 3 bis 5 Tage in CPD oder 1 (maximal 2) Tage in ACD gelagert werden, können eingefroren werden. Sowohl der hohe Glycerinzusatz (40 % W/V) als auch der niedrige Glycerinzusatz (20 % W/V) sind dafür geeignet. Während einer 7-tägigen Lagerung in der Auftauperiode wird bei dem mit hohem Glycerinzusatz eingefrorenen Blut eine geringere Hb-Zunahme im Überstand beobachtet, als bei dem mit der niedrigen Glycerinkonzentration eingefrorenen Blut.

Keine Unterschiede zwischen den beiden Glycerinkonzentrationen fanden sich bei der Bestimmung der Erythrozyten-Überlebenszeit, der Sauerstofftransportfunktion, dem 2,3 DPG- und ATP-Gehalt sowie dem Blut-pH und Blutkörperchen-pH.

Die Beeinflussung des 2,3 DPG-Gehaltes durch "rejuvenation" (Zugabe der PIGPA-Lösung) von entweder frischem (d. h. 1 bis 2 Tage altem ACD-Blut oder 3 bis 5 Tage altem CPD-Blut) oder länger als 3 Wochen gelagertem ACD- bzw. CPD-Blut zeigt die Abb. 6. Im frischen Blut kann dadurch der

2,3 DPG-Gehalt bis auf das Doppelte erhöht werden, während er bei länger gelagertem Blut bis auf etwa 75 % des Normalwertes wieder angehoben werden kann.

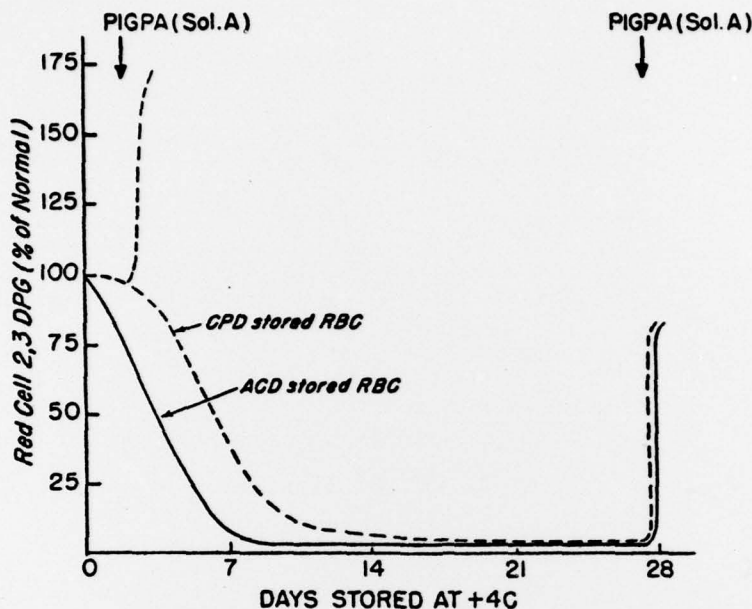


Abbildung 6

Changes in the 2,3 DPG level in red cells stored at 4°C for 28 days in either acid-citrate-dextrose (ACD) or citrate-phosphate-dextrose (CPD). Some of the red cells were stored at 4°C in CPD for 3 to 5 days, incubated with the PIGPA, Solution A at 37°C for 1 hour, glycerolized to achieve 40% W/V, stored at -80°C, thawed, and washed. Other red cells were stored in ACD or CPD at 4°C for 28 days, incubated with PIGPA, Solution A, glycerolized to achieve 40% W/V and stored at -80°C before thawing and washing.

Die mit 40 % Glycerinzusatz eingefrorenen und wieder aufgetauten Erythrozyten hatten eine 24-Stunden-Überlebensrate von 85 bis 90 %, die Lebensdauer betrug 90 Tage. Diese Werte wurden auch nach "rejuvenation" von frischem Blut gesehen, während die 24-Stunden-Überlebensrate etwas schlechter war (70 bis 80 %), wenn schon länger konserviertes Blut "rejuveniert" und anschließend eingefroren wurde. Die Lebensdauer dieser Zellen betrug aber ebenfalls 90 Tage.

Einen Vergleich der mit verschiedenen Waschprozeduren erhaltenen Ergebnisse zeigt die Tab. 2. Sie wurden mit dem Verfahren der reversiblen Agglomeration in dem von Huggins entwickelten Cytoglomerat verglichen. Tab. 3 gibt die Resultate wieder, die mit dem Waschen von Blutkörperchen erzielt wurden, die 20 % Glycerinzusatz enthielten.

Diskussion

Die Zugabe von Glycerin zu Blutkörperchen, die eingefroren werden sollen, erfolgt bei niedrigen Glycerinkonzentrationen (20 % W/V) auf einmal. Bei Verwendung höherer Konzentration (40 % W/V) wird zunächst eine kleine Menge hinzugegeben, während die Hauptmenge nach ca. 10 Minuten hinzugefügt wird. Sowohl die Blutkörperchen als auch die Glycerinlösung sollten bei Raumtemperatur gelagert werden.

Glycerin muß vor der Transfusion wieder aus den Erythrozyten entfernt werden. Dies erfolgt heute weitgehend automatisch in einem der drei erhältlichen Wasch-Systeme. Wichtig für eine hohe Ausbeute ist, daß die aufgetauten Blutkörperchen zunächst verdünnt werden. Als Waschlösung wird Kochsalzlösung in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Neben der Entfernung des Glycerins werden durch das Waschen auch Eiweißreste, Hämoglobulin sowie Leukozyten und Thrombozyten entfernt. Offenbar wird auch das Australia-Antigen entfernt bzw. in seiner Konzentration beträchtlich vermindert.

Das letztere ließ sich dadurch nachweisen, daß im Radioimmunoassay (RIA) positiven Blut nach dem Einfrieren, Auftauen und Auswaschen im 100-fach konzentrierten Überstand kein Au-Antigen im RIA mehr nachgewiesen werden konnte.

Der Recovery-Prozentsatz betrug bei den Glycerintechniken 90 %, derselbe Wert wurde auch für die 24-Stunden-Überlebenszeit gefunden (sofern frische Erythrozyten eingefroren wurden). Durch das Einfrieren und Waschen wird der 2,3 DPG- und ATP-Gehalt sowie der P_{50} -Wert nicht ungünstig beeinflusst.

Durch eine "rejuvenation" wird der 2,3 DPG-Gehalt bei frischen Blutkörperchen bis auf das Doppelte erhöht, bei länger gelagerten Blutkörperchen auf etwa 75 % des Normalwertes wieder angehoben.

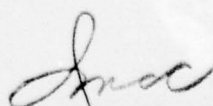
Nach dem Auftauen und der Entfernung des Glycerins dürfen die Blutkörperchen maximal 24 Stunden in einer Kochsalz-Phosphat-Lösung gelagert werden. Kurz vor der Transfusion wird nochmals zentrifugiert und der Überstand entfernt (Hämatokrit 75-80 V %).

Literatur

1. Valeri CR: Recent advances in techniques for freezing red cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1:381-425, 1970.
2. Valeri CR: 24-Hour posttransfusion survival and oxygen transport function of red cells frozen with 40% W/V glycerol and stored at -80°C for up to 2-1/2 years. *Transfusion* (in press).
3. Valeri CR: Metabolic regeneration of depleted erythrocytes and their frozen storage. In *The Human Red Cell In vitro* (American National Red Cross Fifth Annual Scientific Symposium), May 7-8, 1973.
4. Valeri CR, Zaroulis CG: Cryopreservation and red cell function. In *Progress in Transfusion and Transplantation*, edited by PJ Schmidt (American Association of Blood Banks), Washington DC, 1972.
5. Valeri CR, Zaroulis CG: Rejuvenation and freezing of outdated stored human red cells. *New Eng J Med* 287:1307-1313, 1972.
6. Valeri CR, Szymanski IO, Runck AH: Therapeutic effectiveness of homologous erythrocyte transfusions following frozen storage at -80°C for up to seven years. *Transfusion* 10:102-112, 1970.
7. Valeri CR, Fortier NL: Red cell 2,3 diphosphoglycerate and creatine levels in patients with red cell mass deficits or with cardiopulmonary insufficiency. *New Eng J Med* 281:1452-1455, 1969.
8. Kraml M: A semi-automated determination of phospholipids. *Clin Chim Acta* 13:442-448, 1966.
9. Hawks PB, Oser BL, Summerson WH: *Practical Physiological Chemistry*. 13th edition, New York, McGraw-Hill Book Company, 1954, p 564.
10. Kalckar HM: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I. Determination of hydroxypurine compounds. *J Biol Chem* 167:429-443, 1947.
11. Runck AH, Valeri CR: Continuous-flow centrifugation washing of red blood cells. *Transfusion* 12:237-244, 1972.
12. Bellingham AJ, Huehns ER: Oxygen dissociation in red cells from patients with abnormal haemoglobins and pyruvate kinase deficiency. *Forsvarsmedicin* 5:207-211, 1969.
13. Hilpert P, Fleischmann RG, Kempe D, and Bartels H: The Bohr effect related to blood and erythrocyte pH. *Am J Physiol* 205:337-340, 1963.
14. Crowley JP, Valeri CR: The purification of red cells for transfusion by freeze-preservation and washing. I. Mechanism of leukocyte removal from washed, freeze-preserved red cells. *Transfusion* (in press).
15. Crowley JP, Valeri CR: The purification of red cells for transfusion by freeze-preservation and washing. II. The residual leukocytes, platelets, and plasma in washed, freeze-preserved red cells. *Transfusion* (in press).

DOCUMENT CONTROL DATA - R & D

(Security classification of title, body of abstract and indexing annotation must be entered when the overall report is classified)

1. ORIGINATING ACTIVITY (Corporate author) Naval Blood Research Laboratory 82 East Concord Street Boston, Massachusetts 02118		2a. REPORT SECURITY CLASSIFICATION Unclassified	
		2b. GROUP	
3. REPORT TITLE A SIMPLE METHOD TO WASH FREEZE-PRESERVED RED CELLS CONTAINING 40% OR 20% W/V GLYCEROL USING SODIUM CHLORIDE SOLUTIONS,			
4. DESCRIPTIVE NOTES (Type of report and inclusive dates) Presented at the Symposium on Frozen Blood and Its Clinical Application, (Cont. 11)			
5. AUTHOR(S) (First name, middle initial, last name) CDR ⁽¹⁰⁾ C. Robert Valeri MC, USNR			
6. REPORT DATE November 27, 1973		7a. TOTAL NO. OF PAGES 16 ⁽¹²⁾ ^(17A)	
7b. NO. OF REFS 15			
8a. CONTRACT OR GRANT NO. Program Element: 63706N		9a. ORIGINATOR'S REPORT NUMBER(S)	
b. PROJECT NO. Task Area Number: ⁽¹⁶⁾ MPN06/01		⁽¹⁷⁾ MPN0601	
c. Work Unit Number: 0011		9b. OTHER REPORT NO(S) (Any other numbers that may be assigned this report)	
10. DISTRIBUTION STATEMENT No. 1			
11. SUPPLEMENTARY NOTES University Institute for Immunohematology, Frankfurt, Germany, November 27, 1973, Tiefkühlkonservierung von Erythrozyten Ergebnisse eines Symposiums, pp 19-34		12. SPONSORING/MONITORING AGENCY NAME(S) AND ADDRESS(ES) Naval Medical Research & Development Command National Naval Medical Center Bethesda, Maryland 20014	
13. ABSTRACT Seit über 20 Jahren werden im Naval Blood Research Laboratory, Chelsea, Massachusetts, wissenschaftliche Untersuchungen zur Tiefkühlkonservierung von Blut durchgeführt. Als Schutzsubstanz wird Glycerin in 20% iger bzw. 40% iger Konzentration verwendet. In ACD-stabilisator entnommene Erythrozyten sollen nicht länger als 24 Stunden vor dem Einfrierprozess gelagert werden, weil sonst die Sauerstofftransportfunktion ungünstig beeinflusst wird. Im CPD-stabilisator können die Erythrozyten dagegen 3 bis 5 Tage vor dem Einfrieren gelagert werden. Durch den Einfrier- und Auftauvorgang selbst wird die Sauerstofftransportfunktion der Erythrozyten nicht wesentlich beeinträchtigt. Solche Blutkörperchen werden als "non-rejuvenated" (nicht-verjüngt) angesehen, während Blutkörperchen, die nach einer 3 bis 5 tagigen Lagerung in CPD und anschließender Hinzufügung von Pyruvat, Inosin, Glukose, Phosphat und Adenin (PIGPA) als "indated-rejuvenated" (während der Zulassigen Lagerungszeit verjüngt) betrachtet werden. Wurden Blutkörperchen in ACD oder CPD maximal 28 Tage gelagert, danach mit dieser PIGPA-Lösung versetzt, so werden sie als "outdated-rejuvenated" (nach Ablauf der Lagerungszeit verjüngt) angesehen. Der nach dem Auftauen notwendige Waschvorgang entfernt nicht nur das Glycerin, sondern auch die mit der "rejuvenation"-Lösung (PIGPA) hinzugefügten Substanzen. Das Auswaschen des Glycerins erfolgt durch NaCl-Lösung in einem der drei erhältlichen Waschsysteme (s.u.). <div style="text-align: right;"></div>			

387481

DD FORM 1473 (BACK)
1 NOV 65
(PAGE 2)